

- multi-drug antibiotic regimen in excision of pilonidal sinuses with primary closure: a prospective, randomized, double-blinded pilot study. In *J Colorectal Dis* 2006;21:688-92.
36. Kehlet H, Wilkinson RC, Fischer HB et al. evidence-based, procedure-specific postoperative pain management. *Best Pract Res. Clin Anaesthesiol* 2007; 21:149-59.
37. Doll D, Novotny A, Rothe R et al. Methylene Blue halves the long-term recurrence rate in acute pilonidal sinus disease. *Int j Colorectal Dis* 2008;23: 181-7.
38. Terzi C, Canada AE, Unek T et al. What is the role of mechanical bowel preparation in patients with pilonidal sinus undergoing surgery? Prospective, randomized, surgeon-blinded trial. *World J surg* 2005;29:1465-71.
39. Duxbury MS, Blake SM, Dashfield A et al. A randomised trial of knife versus diathermy in pilonidal disease. *Ann R Surg Engl* 2003;85:405-7b.
40. Erdem E, Sungurtekin U, Nessar M. Are post operative drains necessary with the Limberg flap for treatment of pilonidal sinus? *Dis Colon Rectum* 1998; 41:1427-31.

Tumorstamceller i gliomer – et mål for fremtidig behandling?

Ph.d.-stud. Karina Christensen, professor Henrik Daa Schrøder & 1. reservelæge Bjarne Winther Kristensen

Odense Universitetshospital, Afdeling for Klinisk Patologi

Den seneste forskning har vist, at cancerinitierende celler eller tumorstamceller, som har været kendt inden for leukæmi siden 1990'erne, ligeledes findes i hjernetumorer, mamma-, colon- og pancreascancer. Trods forbedringer i behandlingen af glioblastom, der er den hyppigste primære hjernetumor, er medianoverlevelsen kun på 14,6 måneder. Den dårlige prognose kunne skyldes tumorstamceller, idet det ser ud til, at tumorstamcellerne er ansvarlige for den dårlige effekt af stråle- og kemoterapi hos glioblastompatienter.

En tumorstamcelle defineres som en tumorcelle, der 1) har et uendeligt proliferationspotentiale, 2) er i stand til at forny sig selv og 3) samtidig kan give ophav til mere differentierede tumorceller (**Figur 1**). Kapaciteten til både at danne kopier af sig selv og danne mere differentierede celler beror på evnen til hhv. symmetrisk og asymmetrisk celledeling. Ud over de her nævnte egenskaber, som er fælles for normale stamceller og tumorstamceller, har begge celletyper øget aktivering af antiapoptosekaskader og øget membrantransportaktivitet. Desuden er begge celletyper i stand til at migrere. Tumorstamceller giver anledning til tumordannelse, hvorimod normale stamceller fungerer som et reparationsystem i kroppen ved at opretholde det nødvendige antal specialiserede celler.

Tumorgenese

Indtil for nylig har der været enighed om, at gliomer opstod fra astrocytter, oligodendrocytter eller ependymceller, og de er blevet klassificeret efter deres histologiske karakteristika i overensstemmelse med WHO's kliniske retningslinjer. Ny forskning tyder imidlertid på, at gliaceller og neurale stamcel-

ler er lige gode kandidater til celletyper, hvor tumorgenese kan finde sted, hvilket hænger godt sammen med fundet af tumorstamceller. Mutationer i en normal stamcelle, en progenitorcelle eller en mere moden gliacelle med efterfølgende dedifferentiering er mulige forklaringer på, hvordan tumorstamceller opstår (**Figur 1**).

Hjernetumorstamceller, der er isoleret med anti-CD133-antistof

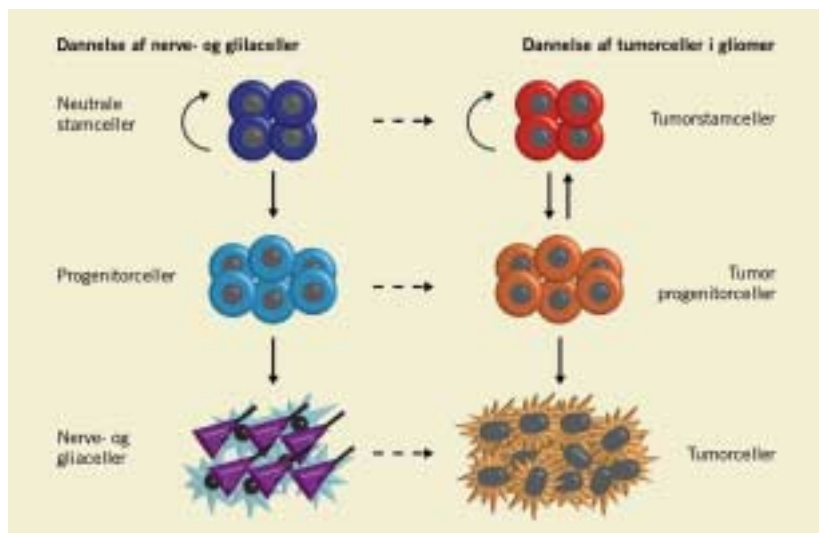
Singh et al brugte som de første plasmamembranproteinet CD133 (prominin-1) til at isolere hjernetumorstamceller fra medulloblastomer, pilocytiske astrocytomer og glioblastomer vha. fluorescensaktiveret celledatering. Intracerebral injektion af blot 100 CD133-positive tumorceller i immundeficiente mus var nok til at initiere tumorer med den oprindelige fænotype. Endvidere var det muligt igen at isolere CD133-positive celler fra disse tumorer og gentage forsøget. Injektion af op til 10^5 CD133-negative celler gav derimod ikke anledning til tumordannelse. Tumorstamcellernes evne til at forny sig selv in vitro var mere udtalt for højgradstumorer end for lavgradstumorer, hvorimod fraktionen af tumorstamceller varierede blandt histologisk identiske tumorer [1, 2].

To funktionelle grupper af CD133-positive celler

Ny forskning inden for hjernetumorer [2] og lungecancer [3] tyder på, at der findes to funktionelle grupper af CD133-positive celler: en med cancerinitierende potentiale, og en med angiogenetisk potentiale. Der var således en signifikant stigning i antallet af CD133-positive endotelprogenitorer i vævssnit fra småcellet lungecancer sammenlignet med raske kontroller, hvilket kunne tyde på, at CD133-positive endotelprogenitorer spiller en rolle for angiogenesen hos disse patienter [3]. Vi har immunhistokemisk påvist CD133-positive endotelceller både i hjernens normale kar og i gliomkar. I in vitro-forsøg er det blevet vist, at CD133-positive glioblast-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Figur 1. Tumorstamcelleparadigmet. Ved dannelsen af nerve- og gliaceller i den normale hjerne er de neurale stamceller øverst i hierarkiet af celler. Hypotesen i tumorstamcelleparadigmet er, at et lignende hierarki findes for tumorceller, hvor kun en lille subpopulation af tumorceller – tumorstamceller – kan initiere en tumor. Tumorstamceller besidder egenskaben til hhv. symmetrisk og asymmetrisk celledeling. Ved symmetrisk deling dannes der to tumorstamceller, og ved asymmetrisk deling dannes der en tumorstamcelle og en tumorprogenitorcelle. Tumorprogenitorceller deler sig og uddifferentierer til tumorceller. Der er ikke på nuværende tidspunkt klarhed over, hvorledes tumorstamceller opstår. Mulige forklaringer kan være, at der sker mutationer i en normal stamcelle, progenitorcelle eller en mere moden gliacelle med efterfølgende dedifferentiering.



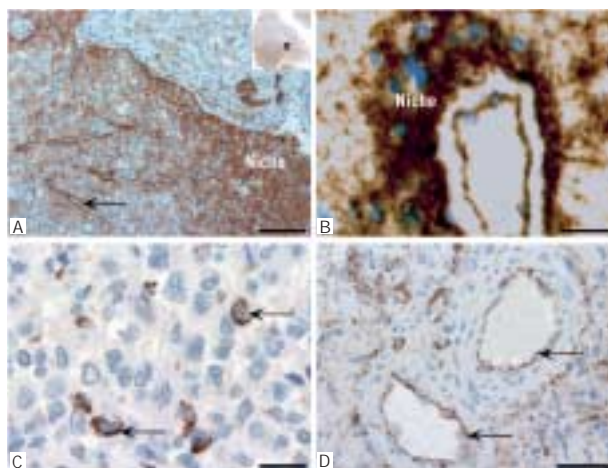
stomceller secernerer et øget niveau af *vascular endothelial growth factor*, som spiller en afgørende rolle i angiogenesisen [4]. Omvendt secernerer endotelceller faktorer, som opretholder den niche, som tumorstamcellerne er lokaliseret i, hvilket tyder på et tæt samspil mellem tumorstamceller og angiogenesis i glioblastomer [5].

Selv om CD133 har spillet en afgørende rolle i opdagelsen af tumorstamceller i hjernetumorer, er der resultater, der tyder på, at der ligeledes findes CD133-negative tumorstamceller. Forsøg med implantation af CD133-negative celler fra humane glioblastomer i hjernen på immundeficiente rotter resulterede således i dannelse af tumorer, som bl.a. bestod af CD133-positive celler. Andre resultater har vist, at fire af 15 undersøgte primære glioblastomer blev opretholdt af tumorstamcellelignende CD133-negative celler, som ved injektion i mus lige så ofte resulterede i tumordannelse som CD133-positive celler. Disse CD133-negative tumorceller havde stamcellekaraktistika, men en anderledes molekylærbiologisk profil og andre vækstkaraktistika end de CD133-positive tumorstamceller [6]. Derudover er det blevet vist, at ikke alle CD133-positive celler er cancerinitierende, idet et studie fandt, at den gennemsnitlige frekvens af cancerinitierende celler blandt CD133-positive coloncancer celler var 1/262. Disse modstridende resultater rejser spørgsmålet om, hvilken renhed der opnås ved cellostering i de enkelte studier, idet en høj grad af renhed er en forudsætning for at kunne undersøge de forskellige egenskaber for CD133-positive versus CD133-negative celler. Derudover var sammensætningen af dyrkningsmediet forskellig i de beskrevne studier, og dette er af afgørende betydning, idet tumorstamcellerne er afhængige af tilstedeværelsen af visse vækstfaktorer og fraværet af andre for at forblive tumorstamceller og undgå uddifferentiering. En genekspressionsanalyse af hjernetumorer viste, at tumorerne udtrykte mange gener, som er karakteristiske for neurale og andre stamceller – bl.a. CD133, SOX2, Musashi-1 og bmi-1 –

dog med variation fra tumor til tumor [7]. Samlet set taler ovennævnte resultater for, at der ud over CD133-positive hjernetumorstamceller også findes undergrupper af CD133-negative hjernetumorstamceller.

Hvor i gliomer er CD133-positive celler lokaliseret?

Vi har undersøgt den immunhistokemiske ekspresion af CD133 i 114 gliomer og fundet, at CD133 er udtrykt i nicher, hvoraf mange er perivaskulære, samt i enkeltliggende tumorceller og blodkar (**Figur 2**). Det stemmer godt overens med de immunhistokemiske resultater fra et xenograftmateriale af humane glioblastomer implanteret i musehjerne [1], hvor det



Figur 2. CD133-immunhistokemisk farvning af gliomer. Immunhistokemisk farvning med et antistof mod tumorstamcellemarkøren CD133 viste, at både diffuse og anaplastiske astrocytomer samt glioblastomer havde CD133-positive nicher. De viste billeder er fra et glioblastom, hvor der både var store (A) og små nicher (B). Det var tydeligt, at mange af nicherne var perivaskulære (B). Også enkeltliggende CD133-positive tumorceller (C, pile) og CD133-positive blodkar (A, D, pile) blev fundet såvel i glioblastomer som i diffuse og anaplastiske astrocytomer. Der var en stor variation imellem gliomer af samme grad såvel som et heterogent mønster i den enkelte biopsi. Målestok = 100 mikrometer (A), 25 mikrometer (B-C) 50 mikrometer (D).

Faktaboks

En tumorstamcelle defineres som en tumorcelle, der har:

1. Uendeligt proliferationspotentiale, men ofte er i dvale.
2. Evnen til at forny sig selv.
3. Evnen til både symmetrisk og asymmetrisk celledeling.

ligeledes er blevet foreslået, at tumorstamceller er lokaliseret i niches. En niche er i denne sammenhæng defineret som et afgrænset og specialiseret mikromiljø, hvis funktion er at opretholde stamcellehomøostase. I den normale hjerne findes neurale stamceller i perivaskulære niches med tæt kommunikation mellem blodkar og niche, og dette mønster synes således også at findes i hjernetumorer.

Alle hidtil publicerede studier viser, at forekomsten af tumorstamceller i astrocytære tumorer er heterogen. I flowcytometriske studier er det angivet, at andelen af CD133-positive tumorstamceller i glioblastomer ligger mellem 2,9% og 29%. I vores immunhistokemiske undersøgelse fandt vi en middellarealfraktion af CD133-positive tumorceller i glioblastomer på 2,2%.

Er tumorstamceller i gliomer resistente over for stråle- og kemoterapi?

En række nye studier støtter hypotesen om, at tumorstamceller i gliomer er årsagen til den udtalte resistens over for stråle- og kemoterapi. Ved bestråling af CD133-positive og CD133-negative glioblastomceller, som efterfølgende blev dyrket in vitro overlevede forholdsvis flere CD133-positive end CD133-negative tumorceller. Resultaterne viste samtidig, at en specifik hæmmer af checkpoint-kinaserne Chk1 eller Chk2 kunne nedsætte overlevelsen af CD133-positive tumorceller, hvilket tyder på, at tumorstamcellernes resistens over for strålebehandling kan modvirkes ved at sigte efter de kontrolsystemer, som udbedrer skader i DNA'et [8]. In vitro-undersøgelse af CD133-positive tumorcellers kemoresistens har vist, at CD133-positive celler er signifikant mere resistente over for kemoterapeutika som f.eks. Temozolomid, Carboplatin, Taxol og Etoposide end CD133-negative celler. Dette kunne skyldes, at CD133-positive celler udtrykte høje niveauer af antiapoptosefaktorer og faktorer, der var involveret i selvfornyelse. Disse faktorer var ikke udtrykt i CD133-negative celler [9]. Senest har et genekspressionsstudie med væv fra 73 glioblastomer vist, at blandt patienter, der blev behandlet med stråleterapi og Temodal, levede patienter med en bestemt stamcelleprofil kortere end patienter uden denne profil.

De eksperimentelle forsøg på at målrette behandlingen mod tumorstamceller ser lovende ud. In vitro-forsøg med afprøvning af det cytotoxiske stof monomethyl auristatin F

(vcMMAF) koblet til CD133-antistoffet har vist, at væksten af den humane cancercellelinie Hep3B (hepatom) kunne hæmmes, formentlig via en selektiv toksisk effekt på CD133-positive tumorceller. Tilsvarende viste forsøg med subkutane Hep3B-tumorer i immundeficiente mus, at intraperitoneale injektioner med CD133-vcMMAF medførte nedsat vækst af tumorerne. Effekten af at blokere Notch-kaskaden med en gammasecretaseinhibitor (GSI) er også blevet undersøgt. Efter eksponering for GSI blev glioblastomceller injiceret i immundeficiente mus, hvilket ikke resulterede i tumordannelse, hvorimod injektion af kontrolceller altid resulterede i tumordannelse. Disse resultater tyder på, at en blokering af Notch-kaskaden rammer tumorstamcellerne og derved hæmmer tumorvæksten. I et fase II-studie med 32 recidiverede grad III-IV-gliomer blev der anvendt en kombination af angiogenesehæmmeren bevacizumab og topoisomerase 1-hæmmeren irinotecan, hvilket resulterede i signifikant antitumoraktivitet [10]. In vitro-forsøg tyder på, at denne effekt kunne skyldes, at bevacizumab forstyrrer samspillet mellem tumorstamceller og blodkar ved at forhindre VEGFs virkning på blodkarrene [5].

Samlet set tyder de nyeste forskningsresultater på, at tumorstamceller i gliomer kunne spille en afgørende rolle i resistensen over for den konventionelle behandling og således være en kilde til recidiv. Samtidig er de første forsøg med nye eksperimentelle behandlinger i gang. De foreløbige resultater tyder på, at behandlingen kan målrettes mod tumorstamcellerne, og de næste år vil vise, hvorvidt disse nye behandlingsstrategier kan komme til at spille en rolle i behandlingen af patienter med glioblastomer.

Korrespondance: Karina Christensen, Afdeling for Klinisk Patologi, Odense Universitetshospital, DK-5000 Odense C.
E-mail: karina.christensen@ouh.regionsyddanmark.dk

Antaget: 9. marts 2008
Interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
2. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
3. Hillbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:965-9.
4. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007;11:69-82.
5. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res* 2006;66:7843-8.
6. Beier D, Hau P, Proescholdt M et al. CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007;67:4010-5.
7. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15178-83.
8. Bao S, Wu Q, McLendon RE et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756-60.
9. Liu G, Yuan X, Zeng Z et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006;5:67-79.
10. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007;13:1253-9.